

ПРОБЛЕМИ БІОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 582.284.3

А.С. Бухало, В.М. Ліновицька

КУЛЬТИВУВАННЯ ВИЩОГО БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* НА АГАРИЗОВАНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

The growth and morphological features of 8 strains of medicinal mushroom *Schizophyllum commune* Fr. from the Culture collection of Mushrooms of the N.G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Sciences of Ukraine, including 3 strains dedicated by the authors in different regions of Ukraine, were studied. The researches were investigated on 14 agar media: wort agar, potato-glucose agar, synthetic medium with L-asparagine or L-asparagine with thiamin, medium of Norkrans, Czapek medium, modified Murashige and Skoog medium without hormones, glucose-pepton-yeast medium. Effect of some organic compounds may be the main or additional source of carbon, such as casein, carboxymethyl cellulose, pectin, starch and gelatin was determined on pepton-yeast medium. As a result, comparison of natural and synthetic mediums in terms of their practical use was determined. Most favorable for growth of the majority strains was beer-wort agar, potato-glucose agar, as well as synthetic medium with asparagine and thiamin. Strains 1590 and 1766 *S. commune* with high level of radial rate of growth on different mediums were selected for following investigation as the biotechnological and mycology application.

Keywords: biotechnology of higher basidiomycetes, *Schizophyllum commune*, agar nutrient mediums, morphological features of colonies.

Вступ

Лікувальні властивості дереворуйнівного вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune* були відомі з давніх часів. У східній медицині його використовували для підвищення імунітету та для лікування гінекологічних хвороб і пухлин молочної залози [1]. В наш час за кордоном на основі *S. commune* виробляють лікарські препарати, які мають імуномодуючу, протизапальну, протипухлинну, антибактерійну, антиоксидантну та гепатопротекторну дію [1–5]. У зв'язку з цим актуальним є створення вітчизняних біотехнологій для одержання з цього гриба лікувально-профілактичних препаратів різної дії.

Необхідною передумовою таких розробок є виділення з природних умов, зберігання в чистій культурі, проведення скринінгу штамів *S. commune* за різними критеріями, а також підбір оптимальних умов культивування вибраних штамів-продуцентів для отримання різноманітних біологічно активних речовин. Водночас у літературі не достатньо повно описано вплив різних компонентів живильних середовищ на культурально-морфологічні характеристики цього гриба, що є важливим для контролювання чистоти культури на усіх стадіях біотехнологічного процесу, а також для вибору кращих для зберігання та промислового використання штамів умов.

Оскільки синтетичні середовища мають точно визначений склад і є технологічнішими, ніж натуральні чи комплексні, а з іншого боку,

саме останні кращі для накопичення біомаси, то існує потреба у визначенні впливу низки компонентів (синтетичних і натуральних) на морфологію та швидкість росту штамів в умовах поверхневої культури на агаризованих середовищах.

Постановка задачі

Мета роботи: оцінка культурально-морфологічних особливостей штамів вищого базидіоміцета *Schizophyllum commune* на агаризованих середовищах різного складу для створення та впровадження біотехнологій виробництва низки біологічно-активних речовин.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були вісім штамів вищого дереворуйнівного базидіального гриба *Schizophyllum commune*, п'ять із яких отримано з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (441, 1590, 1713, 1714 і 5009), а три (18, 1761 і 1766) виділялися авторами з природного середовища на території України.

Ріст і морфологію культур досліджували у чашках Петрі на восьми живильних середовищах різного складу: агаризованому пивному суслі (СА) з 4 % цукру; картопляно-глюкозному агарі (КГА) [6]; синтетичному середовищі (СС) такого складу [6], г/л: NH_4NO_3 – 3, KH_2PO_4 – 1, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,6, глюкоза – 15, до якого додавали L-аспара-

гін (2 г/л) або L-аспарагін (2 г/л) з тіаміном (150 мг/л); середовищі Норкранс (СН) [7]; середовищі Чапека (СЧ) [7]; модифікованому, без гормонів, середовищі Мурасіге—Скуга (СМС) [8]; комплексному глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі (ГПС) [7]. Вплив окремих органічних сполук, що можуть бути основним або додатковим джерелом вуглецю, а саме казеїну (4 г/л), карбоксиметилцелюлози (5 г/л), пектину (5 г/л), крохмалю (2 г/л) та желатину (4 г/л), визначали на середовищі ПС, що складалося з 2,5 г/л пептону та 0,5 г/л екстракту кормових дріжджів.

Інокуляцію проводили міцеліальним диском діаметром 4 мм на живильне середовище у центр чашки Петрі та інкубували протягом 5–10 діб при +28 °С до повного заростання поверхні середовища міцелієм.

Штами оцінювали за лінійною швидкістю радіального росту (V_R = середній радіус колонії/(час культивування, діб)).

Результати і їх обговорення

У результаті проведених досліджень було виявлено мінливість морфології колоній різних штамів *S. commune* на різних середовищах. Залежно від складу живильного середовища та штаму різнилась і лінійна швидкість радіального росту культур (рис. 1).

Найшвидше міцелій ріс на агаризованому пивному суслі (від $11,9 \pm 0,2$ до $17,0 \pm 0,5$ мм/добу у різних штамів). На інших натуральних середовищах спостерігався повільніший ріст: на картопляно-глюкозному агарі та глюкозо-пептонному агарі від $8,5 \pm 0,3$ до $10,6 \pm 0,2$ мм/добу та від $7,2 \pm 0,6$ до $8,3 \pm 0,1$ мм/добу відповідно. Крім того, для колоній на натуральних середовищах був характерним найщільніший міцелій з високими повітряними гіфами (рис. 2).

Так, на СА усі досліджувані штами мали пухнасту колонію білого кольору з рівним краєм, щільним непрозорим шаром субстратного міцелію, повітряним міцелієм висотою 3–5 мм з добре розвинених гіф. На середовищі КГА усі штами мали шерстисту колонію білого кольору зі слабкою радіальною зональністю. Щільність колонії була також велика, але висота повітряного міцелію порівняно з СА була трохи менша (2–3 мм). Культури на глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі утворювали ще менш щільний шерстистий шар міцелію.

На синтетичних середовищах (СЧ, СН, СС і СМС), що містили 15 г/л глюкози, але різнилися складом і кількістю макро- та мікроелементів, спочатку спостерігали ріст переважно моношарового поверхневого міцелію, що утворював прозорий шар. З часом на СН і СС у штамів формувалися пластівчасті колонії бі-

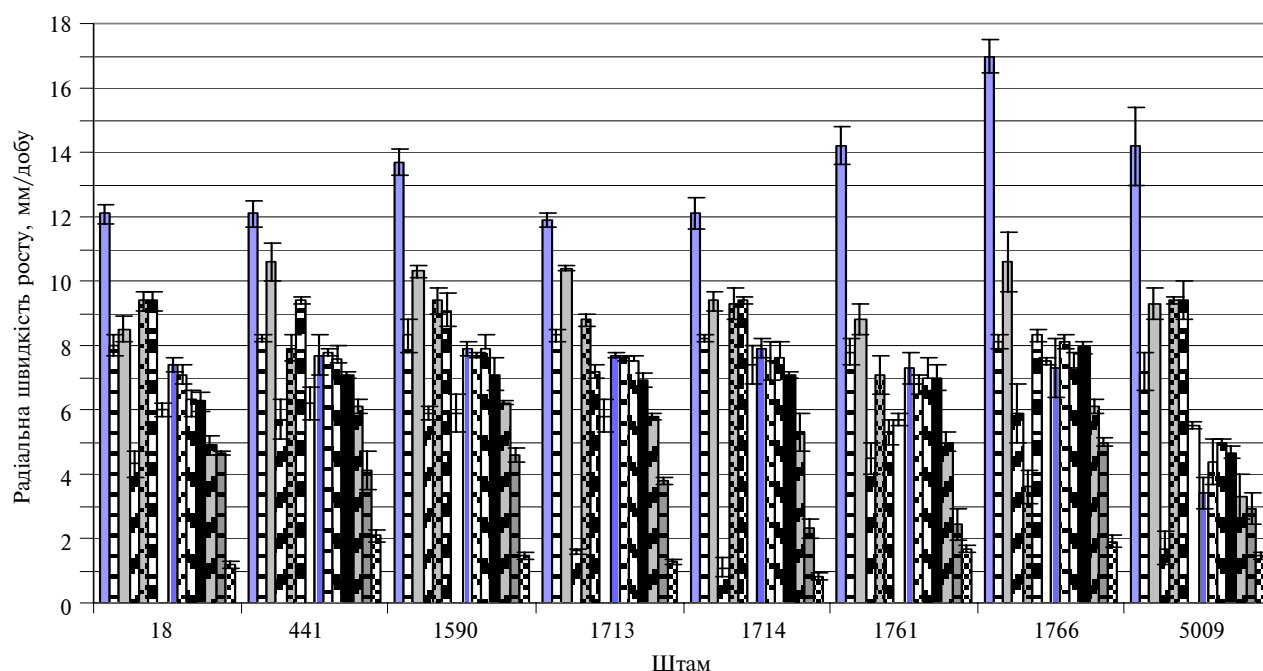


Рис. 1. Радіальна швидкість росту штамів *Schizophyllum commune* на різних середовищах: ■ — СА; ■ — СН; ■ — СС + L-Asn+B1; ■ — ПС + крохмаль; ■ — ГПС; ■ — СС; ■ — ПС+ казеїн; ■ — ПС+КМЦ; ■ — КГА; ■ — СМС; ■ — ПС + желатин; ■ — СЧ; ■ — СС + L-Asn; ■ — ПС + пектин

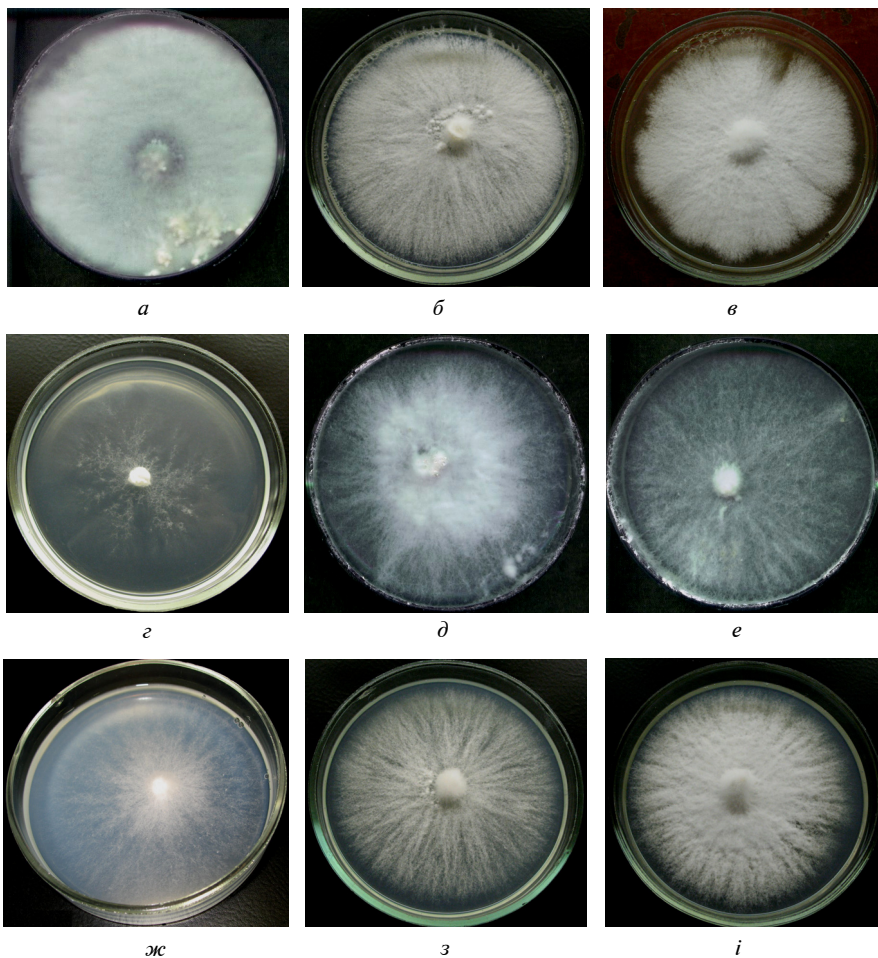


Рис. 2. Колонії *Schizophyllum commune* 1590 на агаризованих живильних середовищах (7 діб): а – СА, б – ГПС, в – КГА, г – СЧ, д – СН, е – СС, ж – СМС, з – СС з L-аспарагіном, і – СС з L-аспарагіном і тіаміном

лого кольору з ділянками міцелію різної висоти (до 2 мм) та щільності. При цьому особливістю росту деяких штамів на частині досліджених синтетичних середовищ є те, що утворення тонкого, практично без повітряних гіфів, міцелію характеризується високою лінійною швидкістю радіального росту. Так, у штамів 18, 1590, 1714 і 5009 швидкість на СН і СС становила від 9,1 до 9,4 мм/добу, що в 1,2–1,4 разу більше, ніж на ГПС, і була практично така сама, як на КГА ($p < 0,05$).

На середовищах Чапека та СМС усі штами *S. commune* росли повільніше (відповідно 1,1–5,9 мм/добу та 5,5–7,4 мм/добу) у вигляді дуже тонкої, прозорої моношарової колонії, без утворення повітряного міцелію та примордій.

Загалом використання саме синтетичних середовищ має свої переваги над натуральними: точний, контрольований склад, легше виділення та очищення екзо- й ендометаболітів

тощо. При цьому важливим питанням при виборі такого середовища є вибір джерел азоту та вуглецю, а також факторів росту, що сприятимуть більшому накопиченню певного цільового продукту. Для *S. commune* в літературі наводяться суперечливі дані щодо цього питання. Поширеними джерелами азоту в агаризованих середовищах вважаються пептон, дріжджовий екстракт, аспарагін, нітрати [6, 7, 9–13]. Крім того, різні автори по-різному оцінюють необхідність для росту та інших фізіологічних процесів тіаміну [6, 7, 9, 10, 12]. Тому було проведено культивування штамів *S. commune* з використанням середовищ з додаванням L-аспарагіну та тіаміну.

На синтетичних середовищах з аспарагіном та з тіаміном і аспарагіном лінійна швидкість радіального росту міцелію у всіх досліджених штамів була дещо нижчою, ніж на КГА і ГПС – від $6,8 \pm 0,3$ мм/добу у штаму 1761 до $7,9 \pm 0,1$ мм/добу у штаму 1713. При цьому дода-

ний у середовище тіамін практично не впливав на швидкість росту колоній, але призводив до збільшення щільності колоній і висоти повітряного міцелію з 0,5–1,0 мм до 2–3 мм (рис. 2).

У рамках визначення впливу різних компонентів живильного середовища на ріст та морфологію *S. commune* також було проведено культивування на пептон-дріжджовому середовищі з додаванням білкових (казеїн або желатин) і вуглеводних (крохмаль, пектин або КМЦ) сполук. У результаті було встановлено, що морфологія колоній і лінійна швидкість радіального росту значно залежали від складу живильного середовища (рис. 3). На середовищах з казеїном, желатином і пектином утворювалися перисті колонії, що характеризувалися схожими значеннями V_R (5,0–7,9, 4,7–7,9 та 3,3–6,2 мм/добу відповідно), а крохмаль і карбоксиметилцелюлоза виявилися несприятли-

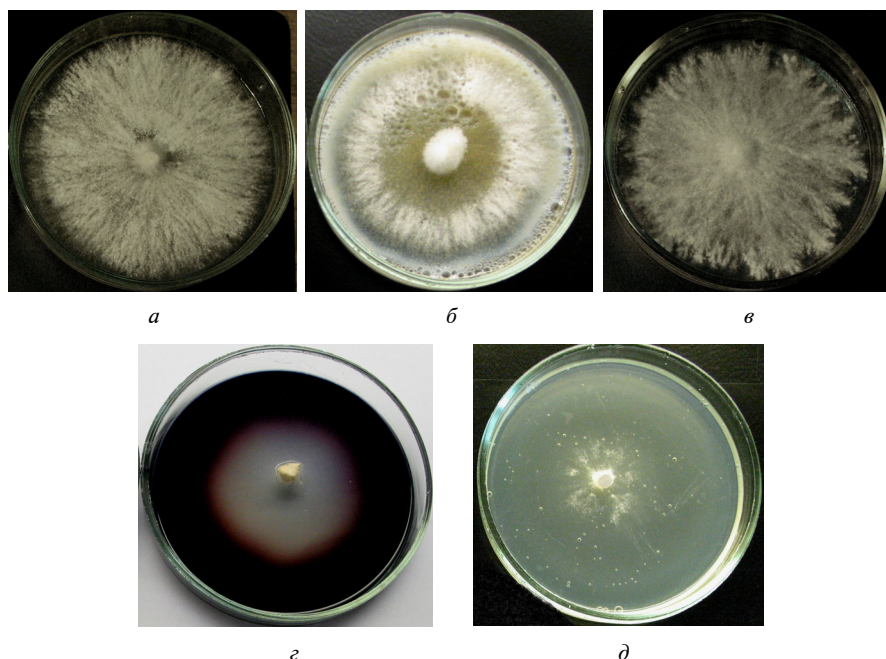


Рис. 3. Колонії *Schizophyllum commune* 1590 на агаризованих живильних середовищах (7 діб): а – ПС із казеїном, б – ПС із желатином, в – ПС із пектином, г – ПС із крохмалем (забарвлення розчином Люголю), д – ПС із карбоксиметилцелюлозою

вими для росту штамів *S. commune* (V_R від 2,3 до 5,0 та від 0,8 до 2,1 мм/добу відповідно).

Отже, дослідження різних натуральних і синтетичних середовищ показало, що для вибору високопродуктивних штамів необхідно орієнтуватись як на радіальну швидкість росту колоній, так і на щільність та висоту міцелію. Так, за даними про лінійну швидкість радіального росту, сприятливішими для отримання міцелію на агаризованих середовищах є СА, КГА, ГПС, СН і СС, а також додавання аспарагіну, казеїну або желатину, оскільки при їх використанні V_R у шести штамів мала достовірно більші значення. Але для точного визначення рівня накопичення біомаси та різних цільових продуктів необхідно здійснювати глибинне культивування вибраних штамів 1590 і 1766, що характеризуються більшими значеннями лінійної швидкості радіального росту та

висотою і щільністю міцелію на більшій кількості середовищ.

Висновки

Отже, в роботі досліджено ріст і морфогенез вісьмох штамів вищого дереворуйнівного базидіального гриба *Schizophyllum commune* на агаризованих середовищах різного складу.

Показано, що склад живильного середовища значно впливав на ріст і морфологію культур. Визначено, що за лінійною швидкістю радіального росту, а також щільністю і висотою міцелію найкращими середовищами для росту всіх досліджених штамів були агаризоване пивне сусло, картопляно-глюкозний агар і синтетичне середовище з L-аспарагіном і тіаміном.

Проведено порівняння натуральних та синтетичних середовищ з точки зору їх практичного використання. В результаті виконаних досліджень було встановлено, що при культивуванні на натуральному глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі, на синтетичних аспарагіновому середовищі з тіаміном і без та комплексних середовищах з казеїном і пектином різниця в лінійній швидкості радіального росту або незначна, або взагалі лежить у межах статистичної похибки ($p < 0,05$). Тому для вибору можливих штамів-продуцентів необхідно орієнтуватись як на швидкість росту колоній, так і на щільність та висоту міцелію.

Таким чином, для подальших біотехнологічних досліджень *S. commune* рекомендовано штамми 1590 та 1766 із застосуванням комплексних і синтетичних середовищ в умовах глибинного культивування.

Список літератури

1. Ch. Hobbs, "Medicinal Mushrooms: An exploration of Tradition, Healing and Culture," Santa Cruz: Botanica Press, 1995, 251 p.
2. S.P. Wasser et al., "Medicinal Mushrooms: Past, Present and Future," Ukr. Bot. J., vol. 5, pp. 499–524, 2002.
3. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: Сб. науч. трудов в 2 т. / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера; Ин-т ботаники ім. М.Г. Холодного НАН України. — К.: Альтепрес, 2012. — 459 с.
4. A. Mansour et al., "Schizophyllum inhibits the development of mammary and hepatic carcinomas induced by 7,12 dimethylbenz(a)anthracene and decreases cell proliferation: comparison with tamoxifen", J. Cancer Res. Clin. Oncol., vol. 138, no. 9, pp. 1579–1596, 2012.

5. *H.H. Arbaayah and Y.U. Kalsom*, “Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts”, *Mycosphere*, vol. 4, no. 4, pp. 661–673, 2013.
6. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — К.: Наук. думка, 1988. — 144 с.
7. *Методы экспериментальной микологии: Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др.* — К.: Наук. думка, 1982. — 561 с.
8. *Мусієнко М.М., Панюта О.О.* Біотехнологія рослин. Навч. посібник. — К.: ВПЦ “Київський університет”, 2005. — 114 с.
9. *Сатон Д., Фотергилл А., Ринальди М.* Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Пер. с англ. — М.: Мир, 2001. — 486 с.
10. *Цизь А.М., Бисько Н.А.* Рост мицелия лекарственных грибов порядка *Aphyllophorales* на различных питательных средах // Успехи мед. микологии. — М.: Нац. академия микологии, 2007. — Т. 9 — С. 266–268.
11. *N. Sutivisedsak et al.*, “Production of schizophyllan from distiller’s dried grains with solubles by diverse strains of *Schizophyllum commune*”, *SpringerPlus*, vol. 2, p. 476, 2013.
12. *I.S. Mohd Kamal et al.*, “Optimization of media for mass production of *Schizophyllum commune* using response surface methodology (RSM)”, in *Proc. MICOTriBE*, pp. 1–8, 2012.
13. *Y.P. Teon and M. Mat Don*, “In vitro Antifungal Activities and Phytochemical Analysis of Filamentous White-rot Fungi, *Schizophyllum commune*”, *Sains Malaysiana*, vol. 42, no. 9, pp. 1267–1272, 2013.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології та біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
11 лютого 2014 року